

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 379—382, Juli 1970

## Aktivität der Catechol-ortho-methyltransferase unter Angiotensineinfluß und beim DOCA<sup>1)</sup>-Hochdruck der Ratte

Von C. BARTH

*Aus der I. Med. Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz  
(Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff)*

(Eingegangen am 11. Februar 1970)

Die Aktivität der Catechol-*o*-methyltransferase (EC 2.1.1.6) und der Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) verschiedener Rattenorgane wurde durch definierte Angiotensinkonzentrationen, die Gefäßkontraktion und Katecholaminfreisetzung auslösen, nicht beeinflusst. Die lösliche Catechol-*o*-methyltransferaseaktivität in Herz und Milz von DOCA-Hochdruckratten zeigte keinen Unterschied im Vergleich zur Aktivität von Normaltieren. Es wird daraus geschlossen, daß die enzymatische Inaktivierung von Katecholaminen weder durch Angiotensin noch beim Mineralocorticoidhochdruck verändert ist.

### *The effect of angiotensin and DOCA<sup>1)</sup>-hypertension on the activity of catechol-ortho-methyl-transferase*

Known concentrations of angiotensin, which cause vessel contraction and catecholamine release, have no effect on the activity of catechol-ortho-methyltransferase (EC 2.1.1.6) and monoamine oxidase (EC 1.4.3.4) in various organs of the rat. The soluble catechol-*o*-methyl-transferase activity in the heart and spleen of DOCA-hypertensive rats was the same as that in normal animals. It is concluded that the enzymatic inactivation of catecholamines is not altered by angiotensin or by mineralo-corticoid hypertension.

Sympathisch innervierte Organe inaktivieren die Mittlersubstanzen Noradrenalin und Adrenalin durch zwei Mechanismen. Zum einen werden sie durch Wiederaufnahme in die speichernden „Grana“ der sympathischen Nervenendigungen vom Wirkort (Rezeptor) entfernt. Zum anderen werden sie durch die Enzyme Catechol-*o*-methyltransferase (EC 2.1.1.6 S-Adenosyl-Methionin: Catechol-*o*-methyltransferase) und Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) in ungleich geringer wirksame Metabolite umgewandelt (Übersicht: (1)). Substanzen, die die Catechol-*o*-methyltransferase hemmen, führen zu einer Potenzierung der Katecholaminwirkung (2, 3).

Folgende Beobachtungen führten zur Fragestellung dieser Untersuchung: Von McCUBBIN und PAGE wurde eine verstärkte Blutdruckwirkung des katecholaminfreisetzenden Tyramin am Hund unter Angiotensininfusionen beschrieben (4).

Beim Mineralocorticoidhochdruck des Menschen wurden ebenfalls potenzierte Blutdruckanstiege auf Katecholamine beobachtet (5). Außerdem gibt es pharmakologische Evidenz dafür, daß Steroide — wie Aldosteron und Corticosteron — die Katecholaminwirkung am Aortenpräparat potenzieren (6).

Wir wollten klären, ob einigen dieser Befunde möglicherweise eine verminderte enzymatische Inaktivierung von Katecholaminen zugrunde liegt. Es wurden deshalb die in-vitro-Aktivitäten der Catechol-*o*-methyltransferase und Monoaminoxidase unter dem Einfluß von Angiotensin II untersucht. An DOCA-Hochdruckratten wurde die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität in Herz und Milz gemessen.

<sup>1)</sup> DOCA = Desoxycorticosteron-Acetat

### Methoden und Material

Es wurden Chemikalien in p. a.-Qualität der Firmen Merck-Darmstadt, und Riedel, Hannover, verwendet.

Bei der Fluorometrie verwendete Lösungsmittel wurden mit 1N HCl, 1N NaOH und dest. Wasser gewaschen. Bei Hemmversuchen wurde entweder das in Ampullen käufliche Hypertensin CIBA (Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-Amid) oder ein von Professor BRUNNER (Fa. CIBA) freundlicherweise zur Verfügung gestelltes, von Zusätzen freies Hypertensin eingesetzt.

#### *Feinchemikalien*

S-Adenosyl-Methionin-Jodid, Dihydroxybenzoesäure, D,L-Nor-metanephrin-Hydrochlorid von Calbiochem.

S-Adenosyl-Methionin-Methyl-<sup>14</sup>C (New England Nuclear, Dreieichenhain).

L-Noradrenalin-Hydrochlorid (Fa. Schuchardt, München).

#### *Apparate*

Radioaktivitätsmessungen erfolgten im Flüssigkeitsszintillationsgerät der Fa. Packard (Serie 314 EX). In organischem Lösungsmittel gelöste Proben wurden in 10 ml Toluolszintillator + 1 ml Hyamin gemessen. Einstellung des Geräts auf „balance point operation“ ergab eine konstante Zählrate von 68—70% für diese Meßbedingungen (internal standard-Methode). Die Zählrate wurde rechnerisch bei Bestimmung der Radioaktivität berücksichtigt. In Wasser gelöste Proben wurden in BRAY's Szintillator gemessen (7).

#### *Fluorometrie*

Spektralfluorometer der Fa. Beckmann, München. Zentrifugationen erfolgten in der Ultrazentrifuge Modell 40 der Fa. MSE (Rotortemperatur + 4°C).

#### *Enzymaktivität*

Zur Messung der Catechol-*o*-methyltransferase wurde ein 80000 g-Überstand des Rohhomogenats eingesetzt.

Rohhomogenat: 1 g frisches Organ wurde mit 4 ml 1,2proz. KCl nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert. Herz, Milz und Niere wurden vorher kurz mit dem Ultra-Turrax (Fa. Kunkel & Jahnke, Staufen Br.) aufgeschlossen. Das Pistill des Potter-Homogenisators wurde jeweils 12mal auf- und abbewegt.

Alle Arbeitsgänge wurden bei 0° durchgeführt. Das Feuchtgewicht wurde möglichst schnell nach Entnahme der Organe, die zwischenzeitlich in eisgekühlter KCl lagen, und kurzem Abtrocknen auf Filterpapier, bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY (8).

In einigen Experimenten wurde eine etwa 4fach angereicherte Catechol-*o*-methyltransferase-Präparation aus Rattenleber verwendet (9). Das vom Phosphat-Gel eluierte Protein wurde lyophilisiert und bei -18° aufbewahrt.

Bei allen Enzymmessungen wurden Parallelansätze gemacht. Der Mittelwert aus beiden Ansätzen stellt das weiterverwendete Meßergebnis dar. Eine lineare  $\frac{\text{Umsatz}}{\text{Zeit}}$ -Beziehung war stets gewährleistet.

In Kontrollansätzen wurde ausgeschlossen, daß Angiotensin als Akzeptor der Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionin fungiert. Da das verwendete S-Adenosyl-Methionin-Präparat als Jodid eingesetzt wurde, wurde ausgeschlossen, daß die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität durch Jodid beeinflusst wird.

Die Catechol-*o*-methyltransferase wurde mit zwei Methoden gemessen:

In einer Modifikation der von McCAMAN angegebenen Methode mit Dihydroxybenzoesäure als Substrat und <sup>14</sup>C-Methyl-S-Adenosyl-Methionin als Coenzym (10) (Einzelheiten unter Ergebnisse). Für einige Hemmversuche wurde die Methode von AXELROD und Mitarbeitern (9) verwendet. Dabei wird das gebildete Normetanephrin nach Reinigung durch mehrfache Ausschüttelung mithilfe seiner Nativ-Fluoreszenz erfaßt. In Vorversuchen wurde festgestellt, wieviel von 15–150 nMol vorgelegtem Normetanephrin der Messung zugeführt wird. Es ergab sich eine mittlere Wiederfindung von 20,3%. Bei Errechnung der enzymatischen Umsetzung wurde eine Wiederfindung von 20% eingesetzt (Einzelheiten unter Ergebnisse).

Für die Messung der Monoaminoxidase-Aktivität wurde die manometrische Bestimmung nach HAWKINS modifiziert (11). Zur Sicherung der manometrischen Ergebnisse wurde im Trichloroessigsäureüberstand der Warburgansätze das gebildete NH<sub>3</sub> im optischen Test nach WARBURG gemessen (12).

Als Homogenat wurde ein nicht zentrifugiertes Rohhomogenat eingesetzt. Es wurde durch einen Aufschluß von 1 g Frischgewicht mit 3 ml 0,25M Sucrose (3 mM Na-EDTA, 0,01M Phosphat, pH 7,0) gewonnen. Das Zentralgefäß enthielt 0,01 ml 50proz. KOH. Die Gasatmosphäre war 100% O<sub>2</sub>. Der „Standardansatz“ enthielt in 2,0 ml: 1,0 ml Homogenat; KCN 2 µMol; Semicarbazid 20 µMol; Phosphatpuffer, pH 7,4 100 µMol; Tyramin 20 µMol. Alle Reagenzien wurden vorher auf pH 7 neutralisiert. Angiotensin wurde durch Messung der pressorischen Aktivität an der narkotisierten Ratte bestimmt.

#### Statistik

Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem t-Test.

#### Tiermaterial

Sprague-Dawley-Ratten, männlich. Die für die Hemmversuche eingesetzten Homogenate wurden von 250–300 g schweren Tieren gewonnen.

DOCA-Hochdruck-Ratten<sup>2)</sup>: 120 g schwere Tiere wurden linksseitig nephrektomiert und erhielten 2mal wöchentlich s. c. Injektionen von Desoxycorticosteron (Percorten Ciba, 5 mg/100 g Körpergewicht).

Die Tiere erhielten 1proz. NaCl-Lösung, die Kontrolltiere Leitungswasser als Trinkflüssigkeit. Die Tötung der Tiere erfolgte 7–12 Wochen nach der 1. DOCA-Injektion. Die Tiere wogen zu diesem Zeitpunkt 250–300 g.

Die Blutdruckwerte des Hochdruck-Kollektivs lagen zwischen 135 und 215 mm Hg, die des Normal-Kollektivs betragen im Mittel 101 mm Hg (Schwankungsbereich 90–105 mm Hg) (plethysmographische Messung nach BYROM und WILSON (13)).

<sup>2)</sup> Für die Bereitstellung der DOCA-Ratten sei Dr. DISTLER und Dr. LIEBAU, I. Med. Klinik der Universität Mainz, herzlich gedankt.

## Ergebnisse

### Hemmversuche

Für Untersuchungen des Einflusses von Angiotensin auf die Catechol-*o*-methyltransferase mußte zunächst ein angiotensinasefreies Präparat gewonnen werden. Rohhomogenate von Gehirn (0,2 ml) und Herz (0,2 ml) inaktivieren bereits nach 7 Min. über 90% von 200 ng Angiotensin II (Tab. 1). Gleich starke Inaktivierung bewirken 2 µl eines Leberhomogenates während 60 Min.

Tab. 1

Einfluß einer EDTA-Dialyse auf die „Angiotensinase“ verschiedener Organe.

Ansatz: Hypertensin „Ciba“ 400 ng; Tris-HCl 10 µMol, pH 7,8; MgCl<sub>2</sub> 15 µMol; Inkubation während 7 Min. in 1,0 ml. Messung im hitzeentweißen Überstand. 100% = Kontrollansätze ohne Organextrakt

	Wiederfindung von Angiotensin in Prozent der Kontrollen	
	Rohhomogenat	EDTA-behandeltes Homogenat
Gehirn 0,2 ml	3%	53%
Herz 0,2 ml	9%	67%
Niere 0,1 ml Verdünnung 1:30	75%	80%

Eine Dialyse gegen EDTA (14) bewirkte eine weitgehende Inaktivierung der Angiotensin-zerstörenden Aktivität (Tab. 1). Dabei war nur im Nierenhomogenat eine größere Einbuße der Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität als 26% gegenüber dem nichtdialysierten Homogenat festzustellen. Die nach AXELROD angereicherte Catechol-*o*-methyltransferase-Präparation erwies sich als angiotensinasefrei.

Tabelle 2 zeigt, daß 400 ng Angiotensin II pro ml die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität aus Gehirn, Herz

Tab. 2

Einfluß von Angiotensin auf die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität verschiedener Organe.

Ansatz: In 1,0 ml wurden inkubiert für 7 Min. bei 38°: Tris-HCl, pH 7,8, 65 µMol; Mg<sup>++</sup> als Chlorid 20 µMol; Dihydroxybenzoesäure 1,3 µMol; S-Adenosyl-Methionin-Methyl-<sup>14</sup>C 86 000 Zerfälle/Min. (= 0,6 nMol); S-Adenosyl-Methionin-Jodid 4,6 nMol-wo angegeben, wurden dem Ansatz 400 ng Hypertensin „Ciba“ zu Beginn der Inkubation zugesetzt; als Catechol-*o*-methyltransferase-Präparation wurden 0,2 ml eines Organhomogenats (1:3 mit 1,2 proz. KCl hergestellt), das bei 80 000 g von partikulären Bestandteilen befreit war, verwendet; Hirn- und Herzhomogenat waren durch Dialyse gegen 3 mM Na-EDTA von Angiotensinaseaktivität weitgehend befreit worden; Nierenhomogenat wurde undialysiert eingesetzt; Stop und Messung wie in Methodik

Homogenat aus	Gehirn	Gehirn	Herz	Herz	Niere	Niere
Hypertensin	+	—	+	—	+	—
Umsatz nMol/7 Min.	0,345	0,348	0,419	0,466	0,410	0,399

und Niere nicht beeinflussen. Auch bei Herabsetzung der Substratkonzentration in den Michaelis-Menten-Bereich fand sich keine Beeinflussung durch Angiotensin II (Tab. 5). Auch bei Vorinkubation des Enzyms mit Angiotensin II ließ sich keine Veränderung feststellen (Ansatz 11). Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Angiotensinkonzentration am Ende der Inkubation in allen Hemmansätzen über 450 ng/ml lagen. Die mittlere Angiotensinkonzentration während der Inkubationsdauer lag also bei 700 ng/ml.

Tab. 3

Einfluß von Angiotensin auf die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität in Niere und Herz bei Untersättigung des Enzyms mit Substrat.

Ansatz: In 1,0 ml wurden während 7 Min. bei 37° inkubiert: Tris-HCl, pH 7,8, 29  $\mu$ Mol; Mg<sup>++</sup> als Chlorid 8,5  $\mu$ Mol; S-Adenosyl-Methionin-Methyl-<sup>14</sup>C 38 400 Zerfälle/Min. (0,77 nMol); S-Adenosyl-Methionin-Jodid 1,5 nMol; Dihydroxybenzoesäure-Konzentration wie angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde den Hemmansätzen zum Beginn der Inkubation „Hypertensin Ciba“ zugesetzt; als Catechol-*o*-methyltransferase-Präparat diente entweder die 1:20-Verdünnung eines partikel-freien Nierenhomogenats (1:3 mit 1,2 Proz. KCl hergestellt, bei 80000 g zentrifugiert) oder ein auf gleiche Weise hergestelltes Herzhomogenat, das zusätzlich gegen 30  $\mu$ M EDTA dialysiert worden war. Stop und Messung wie in Methodik.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*)	12	13
Homogenat Niere (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10							
Homogenat Herz (ml)							0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Dihydroxybenzoesäure mm	0,02	0,02	0,06	0,06	0,15	0,15	0,02	0,02	0,06	0,06	0,06	0,15	0,15
Angiotensin ( $\mu$ g)	—	1,0	—	1,0	—	1,0	1,0	—	1,0	—	1,6*	1,0	—
nMol Dihydroxybenzoesäure methyliert pro Ansatz	0,298	0,280	0,452	0,452	0,561	0,525	0,162	0,094	0,197	0,198	0,202	0,246	0,241
$\mu$ g Angiotensin wieder gefunden pro Ansatz nach Stop der Reaktion		0,600		0,500		0,550	0,500		0,450				

\*) Im bezeichneten Ansatz wurde das Homogenat für 7 Min. bei 37° mit dem Angiotensin vorinkubiert vor Start der Reaktion mit Dihydroxybenzoesäure und Coenzym.

Die bisher dargelegten Befunde waren mit einer Methode gewonnen, bei der als Substrat Dihydroxybenzoesäure angeboten wurde. Dieses Substrat wird mit einer größeren Wechselzahl als Noradrenalin methyliert. Um die Nichtbeeinflussung der Catechol-*o*-methyltransferase durch Angiotensin II auch für das natürliche Substrat zu sichern, wurden die Experimente mit Noradrenalin als Substrat wiederholt. Tabelle 4 zeigt, daß die Methylierung von Noradrenalin unbeeinflusst von Angiotensin abläuft.

Die Abbildung 1 zeigt, daß die *Monoaminoxidase-Aktivität* der Leber und des Herzens durch Angiotensin in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml nicht beeinflusst wird.

Tab. 4

Einfluß von Angiotensin auf die Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität der Leber mit Noradrenalin als Substrat.

Ansatz: Je 2 Ansätze dieser enzymatischen Ansätze sind Parallelansätze bis auf 7 und 8. Sie enthalten in 1,0 ml außer den tabellarisch aufgeführten Zusätzen: S-Adenosylmethionin 0,1  $\mu$ Mol, MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ Mol, Tris-HCl (pH 7,8) 50  $\mu$ Mol, Noradrenalin-HCl 0,3  $\mu$ Mol. Inkubation 30 Min. bei 37°. Stop durch Zufügung von 0,5 ml Boratpuffer, pH 10,0. Versuchsanordnung und Fluorometrie sonst wie in Methodik angegeben.

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8
Angereicherte Leber-Catechol- <i>o</i> -methyltransferase in ml (3,66 mg Protein/ml)	0,60	0,60	0,30	0,30	0,60	0,60	—	—
Angiotensin (Hypertensin „Ciba“) in ng	—	—	—	—	500	500	500	—
Photometerausschlag (Fluoreszenzintensität)	55	60	38,5	39,5	55,5	57	5	7
Daraus errechnete Umsetzung (in nMol Normetanephrin entstanden pro Ansatz	2,10	2,26	1,34	1,38	2,12	2,06	—	—

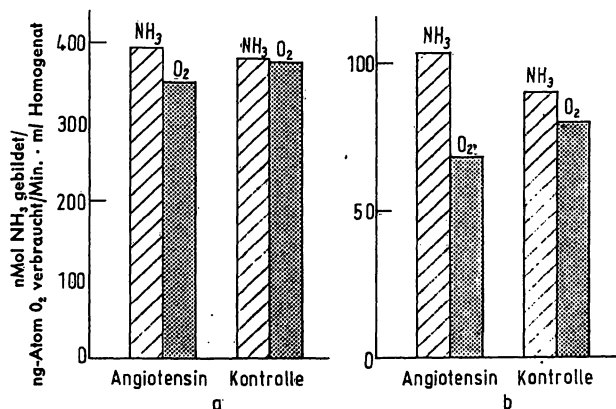


Abb. 1

Monoaminoxidaseaktivität in Leber (a) und Herz (b) mit und ohne Einfluß von Angiotensin II

Nach Ende der Inkubation waren durch das Leberhomogenat 90%, durch das Herzhomogenat 10% des zugesetzten Angiotensin inaktiviert.

#### Catechol-*o*-methyltransferase bei DOCA-Hochdruck

Befunde, die eine Potenzierung der Katecholaminwirkung bei endokrin verursachten Hypertonien nahelegen, ließen eine Untersuchung der Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität in Organen von DOCA-Hochdruckratten wichtig erscheinen.

Wie Tabelle 5 ergibt, zeigten die Enzymaktivitäten in Herz und Milz von Normal- und Hochdrucktieren keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $0,5 < p < 0,6$ ). Die Messung erfolgte im 80000 g-Überstand des Rohhomogenates; Dihydroxybenzoesäure wurde als Substrat verwendet.

Tab. 5

Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität in Herz und Milz von Kontrolltieren und Hochdrucktieren; n = Zahl der Tiere

spezifische Aktivität [pMol/Min. · mg Protein] $\bar{x} \pm s$		
Normal		Hochdruck
Herz	2,055 $\pm$ 0,356 n = 5	1,936 $\pm$ 0,202 n = 5
0,50 < p < 0,60		
Milz	6,932 $\pm$ 1,205 n = 4	7,438 $\pm$ 1,350 n = 5
0,50 < p < 0,60		

#### Diskussion

1936 beschrieb BACQ, daß Pyrogallol die Katecholaminwirkung an der Gefäßwand potenziert (3). AXELROD wies 1959 nach, daß die Catechol-*o*-methyltransferase aus Rattenleber durch Pyrogallol in vitro gehemmt wird, und daß die Methylierung von Noradrenalin und Adrenalin in vivo nach Gaben dieses Hemmers vermindert ist (2). Diese Befunde begründen die Auffassung, daß die Catechol-*o*-methyltransferase die Katecholaminwirkung durch enzymatischen Abbau beendet.

Obwohl in den letzten Jahren viele Befunde den Stoffwechsel der Katecholamine aufklären halfen, ist es bislang nicht gelungen, die verschiedenen Formen der krankhaften Blutdruckerhöhung — außer dem Phäochromocytom — mit Anomalien des Katecholaminstoffwechsels ursächlich zu verknüpfen.

SJOERDSMA wies 1961 auf einen möglichen Zusammenhang zwischen enzymatischer Inaktivierung von Katecholaminen und Hypertonie hin (15). Er untersuchte die Methylierung von D-Isoproterenol und fand an einem Kollektiv von 3 Hypertonikern keine Veränderung gegenüber Normalen.

Es erschien daher untersuchenswert, ob Angiotensin, das bei den renalen Hochdruckformen eine ursächliche Rolle spielt, und dessen enge Verknüpfung mit der Physiologie des Sympathicus mannigfach gezeigt wurde (16, 4, 17), über eine Beeinflussung der Catechol-*o*-methyltransferase die Katecholaminwirkung potenziert. Es ließ sich zeigen, daß die Catechol-*o*-methyltransferase aus verschiedenen Geweben durch Angiotensin nicht beeinflusst wird. Dabei wurde eine definierte Angiotensinkonzentration in den Hemmansätzen durch vorherige Inaktivierung von „Angiotensinasen“ aufrechterhalten.

Die Monoaminoxidase-Aktivität aus Leber und Herz zeigte ebenfalls keine Beeinflussung durch Angiotensin. Es bleibt allerdings die Frage, ob eine Aktivitätsbestimmung in vitro die zellphysiologische Funktion der Monoaminoxidase adäquat widerspiegelt. Dieses Enzym ist fast ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert und zeigt möglicherweise Regulationsphänomene nur bei intakter Zellstruktur. Obwohl die Angiotensinase-Aktivität in diesen Versuchen nicht vorher entfernt

wurde, so lag doch der Angiotensinspiegel in allen Ansätzen über 150 ng/ml. Diese Konzentration erscheint ausreichend, denn deutliche Effekte werden am Aortenpräparat bereits bei Angiotensinkonzentrationen von 100 ng/ml beobachtet (17). In den Geweben von DOCA-Hochdrucktieren ließ sich keine veränderte Catechol-*o*-methyltransferase-Aktivität nachweisen.

Die angeführten Untersuchungen lassen somit folgende Schlüsse zu: Weder bei Zuständen erhöhten Angiotensinspiegels, also z. B. bei der renalen Hypertonie, noch beim Mineralocorticoidhochdruck findet sich eine veränderte enzymatische Inaktivierung von Katecholaminen. Eine solche Veränderung kann somit nicht als Erklärung für eine verstärkte (potenzierte) Wirkung von Katecholaminen bei diesen Zuständen dienen. Wie erwähnt, verfügen die sympathischen Nervenendigungen neben der enzymatischen Inaktivierung über einen Alternativ-Mechanismus zur Entfernung der Katecholamine vom Rezeptor mit Hilfe eines Rücktransportes in die speichernden „Grana“. Aussichtsreich erscheint es, diesem Abschnitt des Katecholaminstoffwechsels vermehrt Aufmerksamkeit zu schenken. Wie AXELROD und Mitarbeiter mitteilten, ergab sich eine verminderte Bindungsfähigkeit der Gewebe von DOCA-Hochdrucktieren für Noradrenalin und damit ein erster Hinweis für eine Veränderung seiner Verteilung über die Kompartimente (18).

### Literatur

1. WURTMANN, R. J., N. England, J. Med. 273, 637 (1965). —
2. AXELROD, J., und M.-J. LAROCHE, Science Washington 130, 800 (1959). — 3. BACQ, Z. M., Arch. internat. physiol. 42, 340 (1936). — 4. McCUBBIN, J. W., und I. H. PAGE, Circulation Res. 12, 553 (1963). — 5. DISTLER, A., CHR. BARTH, H. LIEBAU, P. VESCEI, und H. P. WOLFF, unveröffentlichte Beobachtungen. 6. BOHR, D. F., Canad. Med. Ass. J. 90, 174 (1964). — 7. BRAY, G. A., Analyt. Biochem. 1, 279 (1960). — 8. LOWRY, O., J. biol. Chemistry 193, 265 (1951). — 9. AXELROD, J., und R. TOMCHICK, J. biol. Chemistry 233, 702 (1958). — 10. McCAMAN, R. E., Life Sci. 4, 2353 (1965). — 11. HAWKINS, J., Biochem. J. 50, 577 (1952). —
12. SCHMIDT, F. H., und M. SCHWARZ, Kli. Wschr. 44, 591 (1966).
13. BYROM, F. B., und C. WILSON, J. Physiol. 93, 301 (1938). —
14. KHAIRALLAH, P. A., F. M. BUMPUS, I. H. PAGE, und R. R. SMEBY, Science Washington 140, 672 (1963). — 15. SJOERDSMA, A., Circulation Res. 9, 734 (1961). — 16. FELDBERG, W., und G. P. LEWIS, J. Physiol. 171, 98 (1964). — 17. DISTLER, A., H. LIEBAU, und H. P. WOLFF, Nature London 207, 4998 (1965). — 18. CHAMPLAIN, J. de, L. R. KRAKOFF, und J. AXELROD, Circulation Res. 20, 136 (1967).

Dr. Chr. Barth  
Biochem. Institut  
78 Freiburg i. Br.  
Hermann-Herder-Str. 7